

Neurotrophin 拮抗 6-OHDA 诱导大鼠早期黑质多巴胺能神经元的凋亡

栾 萍¹, 刘 军², 肖颂华², 周道有², 李庆军²

(1. 广州经济技术开发区医院内科, 广东 广州 510730; 2. 中山大学附属第二医院神经科, 广东 广州 510120)

摘 要: **目的】**探讨神经托平(neurotrophin)对 6-OHDA 诱导的 SD (Sprague-Dawley)大鼠黑质多巴胺能神经元极早期凋亡的拮抗作用。**方法】**实验组 SD 大鼠, 按完全随机设计分 3 组, 每组 16 只, 分别用神经托平 15、30、45 $\text{U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔内注射, 对照组 (2 只) 用等体积的生理盐水腹腔内注射。2 周后用 6-OHDA 立体定向注射于大鼠纹状体区。在 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、1 周及 2 周时采用原位末端标记法 (TUNEL) 检测黑质细胞的凋亡, 用流式细胞仪检测凋亡率, 用免疫组化法检测纹状体区多巴胺能神经纤维的含量的变化。**结果】**对照组在 6-OHDA 作用后的 6 h 即可检测到黑质细胞凋亡, 在 48 h 达到高峰, 凋亡率 $6.4\% \pm 0.2\%$; 神经托平 30、45 $\text{U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 预处理后则可降低细胞凋亡 ($P < 0.05$), 其中 45 $\text{U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 预处理组在 48 h 仅为 $2.3\% \pm 0.1\%$, 与实验组比有统计学意义, 同时纹状体区多巴胺能神经纤维含量的减少较对照组亦有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 15 $\text{U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组则无明显效果。**结论】**大剂量神经托平可拮抗神经毒性物质对黑质神经元的凋亡作用, 避免了投射至纹状体区多巴胺能神经递质的减少, 为今后探讨帕金森病的防治提供了重要的理论依据。

关键词: 帕金森病; 黑质; 细胞凋亡; 神经托平**中图分类号:** R743.3**文献标识码:** A**文章编号:** 1672-3554(2004)06-0560-04

Antagonistic Effect of Neurotrophin on Apoptosis of Dopaminergic Cells in Substantia Nigra in Rats Induced by 6-Hydroxydopamine

LUAN Ping¹, LIU Jun², XIAO Song-hua², ZHOU Dao-you², LI Qing-jun²

(1. Hospital of Guangzhou Economic and Technological Development Distric, Guangzhou 510730, China;

2. Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: **Objective】**To observe the antagonistic effect of neurotrophin to the acute apoptosis in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion in Sprague-Dawley (SD) rats.

Methods】The experimental group of SD rats were intra-abdominally injected neurotrophin previously in the dosages of 15, 30, 45 $\text{U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, the control group was given the isovolumic normal sodium in the same way. Two weeks later, the rats were intracerebral stereotactically injected of 6-hydroxydopamine (6-OHDA), then the apoptosis of nigral dopaminergic neurons were examined at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 1 week, and 2 weeks after lesioning, using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP nick end labeling (TUNEL) method. Flow cytometry was used to examine the percentage of apoptosis. Furthermore, content of dopaminergic fibers in corpus striatum were detected using tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. **Results】**The apoptosis of dopaminergic neurons in substantia nigra was detected 6 h immediately after 6-OHDA injection in

收稿日期 2004-04-21**基金项目** 广东省医学科研基金资助项目 (A2004593)**作者简介** 栾 萍 (1969), 女, 山东聊城人, 主治医师, 刘 军, 通讯作者. E-mail: docliujun@hotmail.com

control group, and the percentage of apoptosis reached the highest level ($6.4\% \pm 0.2\%$) at 48 h, while lower apoptosis was detected in the group treated previously by neurotrophin in the dosages of 30 and $45 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ($P < 0.05$), and the apoptosis in the group of $45 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ treated group was only $2.3\% \pm 0.1\%$ at 48 h, there was a significant difference in the content of dopaminergic fibers in striatum decreased compared with the control group as well. But no effect in the group of $15 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was observed. 【conclusions】 Large dosage of neurotrophin is against the apoptosis of nigral dopaminergic neurons in acute time course suffered by neurotoxicity, avoiding the decrease of dopaminergic neurotransmitters in corpus striatum, which provided important theoretical evidences for searching an effective way to prevent and cure Parkinson's disease.

Key words: Parkinson's disease; substantia nigra; apoptosis; neurotrophin

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25 (6): 560 - 563]

帕金森病的病理学标志是黑质多巴胺能神经元死亡,但多数研究往往开始于神经毒性物质如 6-羟多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 等对帕金森病动物模型的行为和形态学方面已经造成明显改变后,而其时间往往开始于 2 周以后,此时多巴胺能神经元丧失已经达 60% ~ 80%, 故仍难以明确凋亡是否在黑质神经元死亡中占主要的地位。研究证明,神经解剖学和生化学方面的改变往往集中发生在早期接触毒物的短时间内。如果能在极早期给与保护性的药物干预,将有可能阻止或减少其凋亡的发生。已证实多种神经营养因子对中脑多巴胺神经元有营养保护作用,可部分减轻大鼠模型多巴胺神经元损害。近来发现神经托平 (neurotrophin) 可促进因应激反应或感染等受到损害的神经细胞修复。我们既往的研究证实黑质细胞凋亡是早期帕金森病动物模型黑质细胞死亡的主要方式之一,是纹状体区酪氨酸羟化酶减少的主要原因^[1]。2002 年 8 月至 2003 年 9 月我们进一步探讨不同剂量的神经托平对帕金森病大鼠极早期黑质细胞凋亡的保护作用,为今后探讨该病的防治提供了重要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,质量 190 ~ 210 g (中山大学动物实验中心), 6-羟多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、神经托平 (日本脏器公司), 原位凋亡检测试剂盒 neuroTACSII (R&D 公司), LSAB 试剂盒 (DAKO 公司), 流式细胞仪 (ACSCalibur, BECTON 公司)。

1.2 动物预处理

80 只 SD 大鼠按完全随机设计分为实验组 48 只,对照组 32 只。实验组随机分为 A1、A2、A3 组,每组 16 只,分别予以腹腔内注射神经托平 15、30、 $45 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,对照组则腹腔内注射等体积的生理盐水,持续 2 周。

1.3 大鼠帕金森病动物模型的制作

每组大鼠用体积分数 10% 水合氯醛 ($0.3 \sim 0.35 \text{ mL}/100 \text{ g}$) 腹腔内麻醉。行单侧纹状体两点注射 坐标 1:前囟嘴侧 1.6 mm、正中左侧 2.5 mm、大脑表面腹侧 4.5 mm;坐标 2:前囟尾侧 1.6 mm、正中左侧 4.5 mm、大脑表面腹侧 4.5 mm), 实验组每点注射 6-OHDA 3 μL , 6-OHDA 溶液以除菌的双蒸去离子水 (含 0.2 mg/mL 的抗坏血酸) 配制,其浓度为 5 mg/mL。于 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、1 周及 2 周时进行下列实验。

1.4 原位末端标记法 (TUNEL 法) 检测凋亡

在上述时间点各组大鼠取 1 只,用升主动脉体积分数 4% 福尔马林灌注固定脑组织后,立即取黑质组织,作 5 μm 厚的切片,neuro pore (神经孔) 室温处理后加入蛋白酶 K (1:200 稀释) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,去 DNA 酶水漂洗,阳性对照组用 TACS- 核酸酶 (TACS-nuclease) 孵育 30 min,室温下终止 5 min。末端脱氧核酸转移酶标记缓冲液 (1:10 稀释) 室温下 5 min,末端脱氧核酸转移酶终止缓冲液 (1:10 稀释) 室温下 5 min,磷酸盐缓冲液 (1:10 稀释) 室温下漂洗,链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (streptavidin-HRP) 室温下 5 min,二氨基联苯胺 (DAB) 显色,蒸馏水漂洗,复染,脱色,封片,光镜下观察黑质区细胞凋亡情况。

1.5 流式细胞仪检测

在上述时间点断颈法处死各组大鼠 1 只,取同侧中脑黑质组织,机械法制成细胞悬液,体积分数 70% 乙醇于 4 ℃ 固定 30 min, PBS 漂洗, 300 目尼龙网过滤, 1 000 转/min 离心 5 min, 沉淀物中加 RNase 20 μL (0.5 mg/ μL) 和 PBS 180 μL , 37 ℃ 消化 20 min, 取 1×10^6 mL 细胞, 加入 DNA 特异性染料碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 纹状体区 TH 免疫组化检测

取各组帕金森病模型鼠的纹状体区组织, 作 5 μm 厚的切片, 行酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 免疫组化染色 (ABC 法) 及 HE 染色, 光镜下观察。阳性染色呈棕色, 采用图像分析仪测量纹状体区 TH 染色的平均灰度和平均吸光密度, 计算阳性单位值 (positive unit, PU) 进行定量分析。

1.7 统计学处理

数据分析采用 SPSS8.0 统计软件进行单因素四水平方差分析。

2 结 果

2.1 TUNEL 法检测黑质细胞凋亡

6-OHDA 纹状体区注射后可经轴突逆行运输至黑质, 造成黑质神经元的毁损, 从而形成早期帕金森病模型。对照组在光镜下观察黑质致密部, 可见凋亡的黑质细胞呈棕黄色, 细胞核圆形、皱缩, 较周围正常细胞核明显缩小, 见图 1。

2.2 流式细胞仪检测

检测大鼠黑质细胞 DNA 含量, 测得不同时间点 DNA 含量低于二倍体的细胞 (即凋亡细胞) 所占的百分比 (图 2)。

6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、1 周及 2 周时实验组与对照组黑质细胞的凋亡的百分比结果见

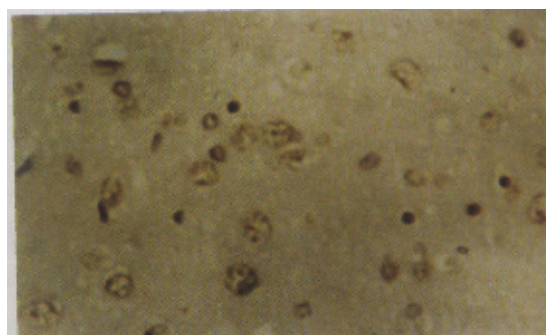


图 1 TUNEL 法检测黑质细胞凋亡

Fig. 1 The apoptosis of substantia cells labeled by TUNEL method ($\times 320$)

The apoptosis of substantia cells are shown in brown, the karyons are rotundity, crimple, and deep colored

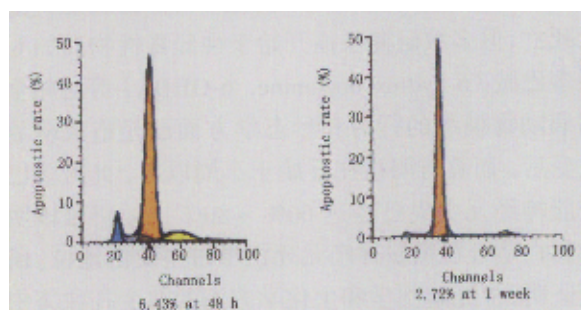


图 2 流式细胞仪检测细胞凋亡率

Fig. 2 The apoptotic rate of substantia cells detected by flow cytometry

表 1。对照组的凋亡在 48 h 最高, 为 $6.4\% \pm 0.2\%$, 在 1 周时为 $2.7\% \pm 0.2\%$, 实验 A1 组与对照组之间差异无统计学意义, 而 A2、A3 组较对照组明显减低, 与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中尤以 A3 组减低最为明显; 在两周时各组之间无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.3 纹状体 TH 免疫组化检测

在 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、1 周及 2 周时大鼠纹状体区呈 TH 染色阳性纤维的平均灰度和平均光密度值, 对照组较实验 A2、A3 组明显减少 ($P < 0.05$), 而 A1 组与对照组间差异无统计学

表 1 6-羟多巴胺诱导下大鼠黑质细胞的凋亡率

Table 1 The apoptotic rate of dopaminergic cells in substantia nigra of the rats induced by 6-hydroxydopamine		%							
Group	n	t (detecting) / h						t (detecting) / W	
		6	12	24	48	72	96	1	2
A1	16	1.7 ± 0.1	3.5 ± 0.1	5.6 ± 0.3	6.4 ± 0.1	4.2 ± 0.1	3.9 ± 0.1	2.7 ± 0.2	1.1 ± 0.2
A2	16	$1.1 \pm 0.1^{1)}$	$1.9 \pm 0.1^{1)}$	$2.6 \pm 0.3^{1)}$	$3.3 \pm 0.1^{1)}$	$2.2 \pm 0.1^{1)}$	$2.3 \pm 0.1^{1)}$	$1.6 \pm 0.2^{1)}$	1.1 ± 0.2
A3	16	$0.6 \pm 0.1^{1)}$	$1.4 \pm 0.1^{1)}$	$2.0 \pm 0.3^{1)}$	$2.3 \pm 0.1^{1)}$	$1.9 \pm 0.1^{1)}$	$1.0 \pm 0.1^{1)}$	$0.6 \pm 0.2^{1)}$	0.9 ± 0.2
Control	32	1.8 ± 0.3	3.4 ± 0.2	5.8 ± 0.4	6.4 ± 0.2	$4.3 \pm 0.2^{1)}$	4.0 ± 0.3	2.7 ± 0.3	1.0 ± 0.1

1) Compared with control group, $P < 0.05$

意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

多个体外实验均证明,某些神经毒性物质如 6-OHDA、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)等可以在体外诱导儿茶酚胺能神经元 PC12 细胞的凋亡^[2,3],我们既往的研究证实^[1],在纹状体区给予选择性的单胺能神经毒性物质 6-OHDA 后 6 h 内即可检测到黑质神经元凋亡,且随着时间的推移,凋亡细胞数目逐渐增多,在 48 h 左右黑质神经元凋亡数目达到最高峰,其后,细胞凋亡的数目又逐渐下降,在两周时则恢复正常。纹状体区 TH 免疫组化表明,随着黑质神经元凋亡,纹状体区 TH 含量逐渐减少,说明了细胞凋亡在帕金森病发病早期的重要作用,是导致投射至纹状体区多巴胺能神经递质减少的主要原因之一。

现已证实多种神经营养因子,如胶质细胞源性神经营养因子、脑源性神经营养因子等对中脑多巴胺神经元有营养保护作用,可部分减轻大鼠模型多巴胺神经元损害^[4,5]。神经托平(neurotrophin)是运用牛痘免疫病毒疫苗接种家兔的皮肤组织,将经过免疫和炎性反应所产生的非蛋白性生理活化物质为成分,提纯精制而成,其药理作用独特。近来研究发现神经妥乐平可促进因应激反应或感染等受到损害的神经细胞修复,而对正常生物体几乎不产生任何影响。最新研究发现,神经托平加入 PC12 细胞培养液中神经轴突生长迅速,细胞膜表面的微绒毛数量亦明显增加,此作用与神经生长因子的神经活化作用相似^[6]。体外实验表明大剂量的神经托平可以抑制多巴胺能神经元凋亡,其机制可能是通过增加一氧化氮合酶的合成而对氧化应激反应产生抑制作用^[7]。

我们通过体内实验的研究表明,神经托平可以通过抑制大鼠帕金森病模型极早期黑质神经元细胞凋亡,避免了投射至纹状体区多巴胺能神经递

质减少,阻止了帕金森病临床症状的产生。该作用同剂量具有一定的相关性,在小剂量下无明显作用,当剂量达到 $30 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 时既可产生效果,进一步增加剂量至 $45 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 时效果更佳。具体作用机制及最合适的应用剂量仍有待今后的进一步探讨。本研究明确了神经托平对黑质多巴胺能神经元凋亡的拮抗作用,为今后探讨该病的防治提供了更为广阔的前景。

参考文献:

- [1] 刘 军,肖颂华,周道有,等. 6-OHDA 诱致大鼠早期黑质多巴胺能神经元凋亡的实验研究[J]. 中华老年医学杂志, 2003, 22(11): 581-3.
- [2] Christina L Z, Vivian K, Nordstroem L A, *et al.* Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion[J]. *Comparative Neuro*, 2000, 427(3): 440-54.
- [3] Mayo J C, Sainz R M, Antolin I, *et al.* Ultrastructural confirmation of neuronal protection by melatonin against the neurotoxin 6-hydroxydopamine cell death[J]. *Brain Res*, 1999, 818(2): 221-7.
- [4] Ostensfeld T, Tai Y T, Martin P, *et al.* Neurospheres modified to produce glial cell line-derived neurotrophic factor increase the survival of transplanted dopamine neurons[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69(6): 955-65.
- [5] Hurelbrink C B, Barker R A. The potential of GDNF as a treatment for Parkinson's disease[J]. *Exp Neurol*, 2004, 185(1): 1-6.
- [6] Shinji M, Yuichi T, Hideki I, *et al.* Differential action of nerve growth factor, cyclic AMP and neurotrophin on PC12 cells[J]. *Cells Struct and Func*, 1988, 8(13): 227-34.
- [7] Higaki A, Ninomiya H, Saji M, *et al.* Protective effect of neurotrophin against lipopolysaccharide-induced hypotension and lethality linked to suppression of inducible nitric oxide synthase induction[J]. *Jpn J Pharmacol*, 2001, 86(3): 329-35.

(编辑 黄小延)